

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005170

International filing date: 22 March 2005 (22.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-170346
Filing date: 08 June 2004 (08.06.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 6月 8日

出願番号
Application Number: 特願 2004-170346

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

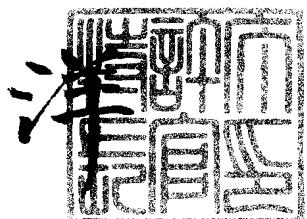
出願人
Applicant(s): チツソ株式会社
藤森工業株式会社

J P 2004-170346

2005年 4月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P-C40646
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07K 14/745
【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋馬喰町一丁目4番16号 藤森工業株式会社
本社内
【氏名】 細川 和也
【発明者】
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋馬喰町一丁目4番16号 藤森工業株式会社
本社内
【氏名】 鹿島 甲介
【特許出願人】
【識別番号】 000002071
【氏名又は名称】 チツソ株式会社
【特許出願人】
【識別番号】 000224101
【氏名又は名称】 藤森工業株式会社
【代理人】
【識別番号】 100100549
【弁理士】
【氏名又は名称】 川口 嘉之
【電話番号】 03-3669-6571
【連絡先】 担当
【選任した代理人】
【識別番号】 100090516
【弁理士】
【氏名又は名称】 松倉 秀実
【選任した代理人】
【識別番号】 100089244
【弁理士】
【氏名又は名称】 遠山 勉
【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2004-80950
【出願日】 平成16年 3月19日
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 192372
【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9712150

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下であるトロンビン誘導体

【請求項 2】

トロンビン基質結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である請求項1に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3】

ヒルジンC末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上である請求項1に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 4】

トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である請求項1に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 5】

ヘパリン結合能が野生型トロンビンと同程度である請求項1～4の何れか1項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 6】

0.1MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸中でトロンビン蛋白質基質と37℃で3時間反応させたときに分解されるトロンビン基質の割合が10%以下である請求項1～5の何れか1項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 7】

トロンビン蛋白質基質が血液凝固第13因子である請求項6に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 8】

トロンビン蛋白質基質がトロンビンレセプター細胞外ドメインのペプチドである請求項6に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 9】

トロンビン蛋白質基質がフィブリノゲンである請求項6に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 10】

0.1MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸に溶解した1mg/mlフィブリノゲン溶液に、終濃度が0.1mg/mlになるように加えて、37℃、3時間インキュベーションしたときにフィブリンクロットを形成させない請求項1～6の何れか1項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 11】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項 12】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも1つのアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項 13】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、グリシン、およびシスティンのいずれかである請求項11または12に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 14】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がグリシンである請求項11または12に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 15】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がアラニンである請求項11または12に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 16】

B鎖の203番目のグリシンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、およびセリンのいずれかである請求項11または12に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 17】

B鎖の99番目のアスパラギン酸を置換するアミノ酸が、アスパラギンである請求項11または12に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 18】

B鎖の43番目のヒスチジンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはアスパラギンである請求項11または12に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 19】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の203番目のグリシンがアラニンに置換され、B鎖の205番目のセリンがグリシンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項 20】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリンがアラニンに置換され、B鎖の43番目のヒスチジンがアラニンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項 21】

さらに、ナトリウム結合部位のアミノ酸が置換された、請求項11～20のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 22】

ナトリウム結合部位のアミノ酸がB鎖の232番目又は234番目のアスパラギン酸である請求項21に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 23】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、ヒルジンC末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である請求項11～22のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 24】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である請求項11～22のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 25】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの10%未満に低下した請求項11～22のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 26】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの10%未満に低下した請求項11～22のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 27】

置換されるアミノ酸がB鎖の77番目のリシンである請求項26に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 28】

B鎖の77番目のリシンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはグルタミン酸である請求項27に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 29】

野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、請求項1～28のいずれか1項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 0】

ヒト野生型トロンビンが配列番号 2 のアミノ酸配列を含む蛋白質である請求項 2 9 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 1】

カルボキシル基が修飾された請求項 1 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 2】

カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された請求項 3 1 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 3 3】

請求項 1 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載のトロンビン誘導体をコードする D N A。

【請求項 3 4】

請求項 1 ～ 3 2 のいずれか 1 項に記載のトロンビン誘導体を含有する医薬組成物。

【請求項 3 5】

抗血栓剤である請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 6】

抗炎症剤である請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

血小板凝集抑制剤である請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 8】

血小板粘着抑制剤である請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 9】

トロンビンレセプター活性化抑制剤である請求項 3 4 ～ 3 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物、特に抗血栓剤、抗炎症剤に関する。

【背景技術】

【0002】

トロンビンは血小板凝集反応や炎症反応などを担う、トリプシンと非常に相同意の高いトリプシン様のセリンプロテアーゼである。例えば、非特許文献1には、トロンビンが、基質であるトロンビンレセプターを活性化することによって血小板凝集反応や炎症反応を起こすことが記載されている。

【0003】

トロンビンの生理的作用に関しては以下の様な報告がなされている。非特許文献2には、トロンビンの主だった血液凝固に関連する基質認識にエクソサイトI領域が重要な働きをすることが記載されている。さらに、非特許文献3には、トロンビン基質蛋白質（以下トロンビン基質）結合能を有した不活性化トロンビンが野生型トロンビン同様にエクソサイトI結合性のトロンビン基質に高い結合能を持つこと、ベンズアミジン等の活性中心へ立体障害となる物質の添加によりその結合能が失われることが記載されている。また、非特許文献4には、トロンビンなどのセリンプロテアーゼは、活性中心にセリン、ヒスチジン、アスパラギン酸を有しており、この3アミノ酸のチャージリーシステムによりプロテアーゼ活性が発現され、セリンプロテアーゼのミカエリス複合体から4面複合体への進展にはグリシン193（193はトリプシンにおけるアミノ酸の位置、トロンビンではB鎖 203位のグリシンにあたる）が関与していることが記載されている。

【0004】

これらをもとに、抗血栓剤等の開発のために、様々なトロンビンの修飾・改変が試みられている。特許文献1には、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって、該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質（以下「反応抑制物質」と言うことがある）を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤が開示されている。さらに該文献には、このセリンプロテアーゼ抑制剤は、抗血栓剤（血栓形成抑制剤）として有効であることが記載されている。該文献には、該反応抑制物質の具体例として、セリンプロテアーゼであるトロンビンと、フェニルメチルスルフォニルフルオリド（以下「PMSF」と言うことがある）などの阻害剤とを反応させ、活性部位に存在するセリンをデヒドロアラニンに転換すること（以下「アンヒドロ化」と言うことがある）により、セリンプロテアーゼ活性が著しく低下したトロンビン誘導体（以下「AHT」と言うことがある）が開示されている。

【0005】

また、特許文献2には、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基とイミドとを反応させ、アンヒドロトロンビンを化学的に修飾したアンヒドロトロンビン誘導体（以下「M-AHT」と言うことがある）が開示されている。M-AHTは、血液中に大量に存在するフィブリノゲンへの結合能が選択的に低いことから、AHTに較べて高い抗血栓効果を有する。

【0006】

一方で、アミノ酸置換を有するトロンビン誘導体の研究も行われている。トロンビンの遺伝子組み換えによる活性中心の置換体はこれまで下記のように幾つかの検討がなされてきた。

【0007】

例えは、非特許文献5には活性中心セリンをアラニンに置換したトロンビンを作製し白血球への影響が述べられている。この誘導体の活性に関しては活性を失ったトロンビン組み換え体と記載されている。また、非特許文献6には、トロンビンB鎖 203グリシン

をアラニンに置換したトロンビン、活性中心セリンをアラニン又はスレオニンに置換したトロンビン、活性中心ヒスチジンをアスパラギンに置換したトロンビン、活性中心アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビンが記載されている。この報告では、活性中心セリンをスレオニンに置換したトロンビン、活性中心ヒスチジンをアスパラギンに置換したトロンビン、活性中心アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビンは、野生型トロンビンに比較し数千から数万分の1に低下しているのに比較し、トロンビンB鎖203グリシンをアラニンに置換したトロンビン及び活性中心セリンをアラニンに置換したトロンビンに関しては活性が完全に失われたと報告している。しかしながら、これら報告のアミノ酸置換誘導体は報告に記載されている測定法では検出不能なレベルのごく僅かなトロンビン基質分解活性が残存していること、あるいはトロンビン基質結合能が著しく低下していることなどにより、抗血栓、抗炎症剤としての十分な機能を有していなかった。

【特許文献1】国際公開第01/03740号パンフレット

【特許文献2】国際公開第02/077031号パンフレット

【非特許文献1】J. Biol. Chem. 261(1986)15928-15933

【非特許文献2】日本血栓止血学会誌 第10巻 2, 3号(1999)

【非特許文献3】Biochemical J. (2001) 354. 309-313

【非特許文献4】ヴォート生化学 上巻 1996年 p331-340 東京化学同人

【非特許文献5】Experimental cell research 219, 650-656(1995)

【非特許文献6】Biochimica et Biophysica Acta 1451(1999) 173-186

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

AHTやM-AHTのように化学的手法により得られたトロンビン誘導体は、抗血栓効果や抗炎症効果を有しているが、セリンプロテアーゼ活性にはらつきがあり、AHTへ変換する際のアルカリ処理、再生処理等の多工程を必要とし、回収率も50から60%と十分ではないという改善すべき点があった。

【0009】

また、従来トロンビンにおいて報告されている多くの配列において活性中心のトロンビン置換体を作成したところ、抗血栓、抗炎症剤としての十分な機能を有していなかった。理由として、これら報告の置換体は抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的なトロンビン基質分解活性を有する、あるいは置換による影響で主にエクソサイト1の構造変化にともないトロンビン基質結合能が著しく低下している等の問題が考えられた。例えばBiochimica et Biophysica Acta 1451(1999) 173-186の中で活性が完全に喪失したと報告される活性中心セリンをアラニンに置換したトロンビン及びB鎖203グリシンをアラニンに置換したトロンビンにおいても、本発明で定義される抗血栓、抗炎症剤として用いる目的においての実質的なトロンビン基質分解活性が残存していた。さらに活性中心ヒスチジン及びアスパラギン酸の置換は活性をより低下させるものの、エクソサイト1の構造変化を招きトロンビン基質結合能が損なわれる場合があった。

本発明は、基質分解活性を実質的に欠き、かつ、十分な基質結合能を有する、抗血栓、抗炎症剤として使用可能なトロンビン変異体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は前述の従来技術の問題点に鑑み銳意研究を重ねた。その結果、トロンビンのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が、遺伝子組換操作により置換されたトロンビンであり且つ抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的にトロンビン基質を分解しないレベルに活性が低下していれば、AHT同様の抗血栓、抗炎症効果が得られる事を見出した。さらに、トロンビン基質結合能を野生型トロンビンと同等に保持してい

れば、より確実に A H T 同様の抗血栓、抗炎症効果が得られる事を見出した。

【0011】

また、トロンビンの活性中心の置換方法についてさらなる検討を行ったところ、トロンビン誘導体において活性中心セリンの置換はアラニン、スレオニン、グリシン、システインへの置換であればエクソサイト I の構造が保持されトロンビン基質結合能が保たれること、その中でもグリシンへの置換がスレオニン、アラニンに対する置換に比べより活性が低下した置換体が得られる事を見出した。

さらに、B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸を置換することにより、エクソサイト I の構造及びトロンビン基質結合能を保持し、且つ抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的なトロンビン基質分解活性を喪失した、抗血栓、抗炎症効果を持ったトロンビン誘導体が得られる事を見出した。

【0012】

本発明者はまた、上記変異体のナトリウム結合領域を置換あるいは修飾することによってさらにトロンビン基質分解活性を低下させることができることを見出した。さらに、上記トロンビン変異体のカルボシキル基を修飾することにより、トロンビン基質特異性がさらに限定され、より少ない使用量で良好な抗血栓効果を得ることができることを見出した。本発明者はそれらの知見に基づいて本発明を完成させた。

【0013】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

(1) 野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下であるトロンビン誘導体

(2) トロンビン基質結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である(1)のトロンビン誘導体。

(3) ヒルジン C 末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上である(1)のトロンビン誘導体。

(4) トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である(1)のトロンビン誘導体。

(5) ヘパリン結合能が野生型トロンビンと同程度である(1)～(4)の何れかのトロンビン誘導体。

(6) 0.1MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸中でトロンビン蛋白質基質と37℃で3時間反応させたときに分解されるトロンビン基質の割合が10%以下である(1)～(5)の何れかのトロンビン誘導体。

(7) トロンビン蛋白質基質が血液凝固第13因子である(6)のトロンビン誘導体。

(8) トロンビン蛋白質基質がトロンビンレセプター細胞外ドメインのペプチドである(6)のトロンビン誘導体。

(9) トロンビン蛋白質基質がフィブリノゲンである(6)のトロンビン誘導体。

(10) 0.1MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸に溶解した1mg/ml フィブリノゲン溶液に、終濃度が0.1mg/mlになるように加えて、37℃、3時間インキュベーションしたときにフィブリンクロットを形成させない(1)～(6)の何れかのトロンビン誘導体。

(11) 野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

(12) 野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも1つのアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体

(13) B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、グリシン、およびシステインのいずれかである(11)または(12)のトロンビン誘導体。

(14) B鎖の205番目のセリンと置換されるアミノ酸がグリシンである(11)または(12)のトロンビン誘導体。

(15) B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がアラニンである(11)または(12)のトロンビン誘導体。

(16) B鎖の203番目のグリシンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、およびセリンのいずれかである(11)または(12)のトロンビン誘導体。

(17) B鎖の99番目のアスパラギン酸を置換するアミノ酸が、アスパラギンである(11)または(12)のトロンビン誘導体。

(18) B鎖の43番目のヒスチジンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはアスパラギンである(11)または(12)のトロンビン誘導体。

(19) 野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の203番目のグリシンがアラニンに置換され、B鎖の205番目のセリンがグリシンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

(20) 野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリンがアラニンに置換され、B鎖の43番目のヒスチジンがアラニンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

(21) さらに、ナトリウム結合部位のアミノ酸が置換された、(11)～(20)のいずれかのトロンビン誘導体。

(22) ナトリウム結合部位のアミノ酸がB鎖の232番目又は234番目のアスパラギン酸である(21)のトロンビン誘導体。

(23) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、ヒルジンC末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である(11)～(22)のいずれかのトロンビン誘導体。

(24) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である(11)～(22)のいずれかのトロンビン誘導体。

(25) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの10%未満に低下した(11)～(22)のいずれかのトロンビン誘導体。

(26) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの10%未満に低下した(11)～(22)のいずれかのトロンビン誘導体。

(27) 置換されるアミノ酸がB鎖の77番目のリシンである(26)のトロンビン誘導体。

(28) B鎖の77番目のリシンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはグルタミン酸である(27)のトロンビン誘導体。

(29) 野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、(1)～(28)のいずれかのトロンビン誘導体。

(30) ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である(29)のトロンビン誘導体。

(31) カルボキシル基が修飾された(1)～(30)のいずれかのトロンビン誘導体。

(32) カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された(31)のトロンビン誘導体。

(33) (1)～(30)のいずれかのトロンビン誘導体をコードするDNA。

(34) (1)～(32)のいずれかのトロンビン誘導体を含有する医薬組成物。

(35) 抗血栓剤である(34)の医薬組成物。

(36) 抗炎症剤である(34)の医薬組成物。

(37) 血小板凝集抑制剤である(34)の医薬組成物。

(38) 血小板粘着抑制剤である(34)の医薬組成物。

(39) トロンビンレセプター活性化抑制剤である(34)～(38)のいずれかの医薬組成物。

【発明の効果】

【0014】

本発明のトロンビン誘導体は、従来の化学的手法により得られたトロンビン誘導体に比べて、より少ない使用量で安定な抗血栓効果を得ることが出来る。なぜならば、従来のAHTやM-AHTのように化学的手法により得られたものに比べ、得られるトロンビン誘導体個々のトロンビン基質分解活性やトロンビン基質結合能のばらつきが実質的に皆無であるからである。さらに、本発明のトロンビン誘導体は、AHTやM-AHTのようにトロンビンからアンヒドロ化、再生処理の多工程を経ずに高回収率で抗血栓、抗炎症作用をもった不活性化トロンビンを得ることが出来る。また、従来の変異体に比べても、トロンビン基質分解活性が低いため、より少ない使用量で安定な抗血栓効果を得ることが出来る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のトロンビン誘導体は、野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの活性よりも低下した誘導体である。ここで数個とは、2～20個、好ましくは2～10個、より好ましくは2～5個を意味する。なお、本発明のトロンビン誘導体は、トロンビン基質への結合能を保持していることが好ましい。

【0016】

ここで野生型トロンビンとしてはヒトの野生型トロンビンが好ましく、配列番号2のアミノ酸配列を含むトロンビンがより好ましい。この配列はヒト野生型トロンビンのA鎖及びB鎖を含む配列である。なお、生体内では、トロンビンは、プロトロンビン(トロンビン前駆体)がXa因子などのプロテアーゼによって切断され、A鎖(例えは配列番号2のアミノ酸番号1～49の領域)及びB鎖(例えは配列番号2のアミノ酸番号50～308の領域)がS-S結合によって架橋された立体構造を有している(血栓・止血・線溶 中外医学社 p164-167)。したがって、本発明におけるトロンビン誘導体は、生体内で前記構造をとることができるものであれば特に制限されず、A鎖及びB鎖の両鎖を含むトロンビンだけでなく、遺伝子組換えや化学合成などで別々に作製されたA鎖とB鎖が生体内に投与され、生体内で前記のA鎖及びB鎖がS-S結合によって架橋された立体構造をとるようになったものも含む。さらに、生体内で前記の立体構造をとることのできるプロトロンビンやプレトロンビンなどのトロンビン前駆体蛋白質も本発明のトロンビン誘導体に含まれる。

【0017】

本発明において、「トロンビン基質への結合能」とは、血液凝固第VIII因子やトロンビンレセプターなどのトロンビン蛋白質基質やその一部のペプチドに対する結合能を意味する。トロンビン蛋白質基質としてはトロンビンレセプターが血栓形成及び炎症作用の進行に非常に重要であり、実質的にはトロンビンレセプターのトロンビンによる活性化を抑制することで血栓形成及び炎症作用は充分抑制される。したがって、トロンビン蛋白質基質としてはトロンビンレセプターのトロンビン結合領域を含むペプチドが好ましい。

【0018】

また、「トロンビン基質への結合能」は、トロンビン蛋白質基質に保存されている領域のアミノ酸配列を有するペプチド、例えは、ヒルジン(末端ペプチドなどに対する結合量を測定することによって確かめてもよい。トロンビンのエクソサイト)は多くの血栓形成、炎症作用を持ったトロンビン基質蛋白質への結合に最も重要な役割を果たす必須の領域として報告されている領域であるが(Journal of Biological Chemistry 1989 Vol 264 8692-8698)、ヒルジン(末端ペプチドはこのエクソサイト)に対し特異的に結合することが知られる(Journal of Biological Chemistry 1991 Vol 266 23633-23636)。特に、血小

板活性化を通じて血栓形成に重要な働きを持つトロンビンレセプターはヒルジンC末端領域に高い相同意を持ち、エクソサイトIへ強固に結合する事が報告されている。よってヒルジンC末端ペプチドに対する結合能を失っているものはエクソサイトIの構造が破壊されトロンビンレセプターをはじめとする多くのトロンビン基質への結合能を失っているものと考えられる。ヒルジンC末端ペプチド（例えば、配列番号3）に対する結合能は、実施例に示すようにヒルジンカラムへのトロンビン誘導体の結合量を測定することによって行うことができる。本発明のトロンビン誘導体は、野生型トロンビン又はアンヒドロトロンビンの1%以上、好ましくは10%以上、より好ましくは80%以上のトロンビン基質結合能を保持していることが望ましい。ここで、アンヒドロトロンビンはトロンビンの活性中心セリンが脱水酸化されたトロンビンであって、具体的には、国際公開第01/03740号パンフレットの実施例1記載のアンヒドロトロンビンを例示することができる。

【0019】

一方、本発明のトロンビン誘導体は、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの活性よりも低下していることが好ましいが、この「トロンビン基質分解活性」は、フィブリノゲン、血液凝固第13因子、トロンビンレセプターなどの生体基質やS2238（シグマ社より入手可）などの合成基質を用いて測定することができる。ただしトロンビン誘導体を化学修飾などにより本来トロンビンの持つ基質特異性を変化させている場合、トロンビン誘導体が特異性を残している基質を選択する必要がある。また、フィブリノゲン凝固活性を確認することによっても「トロンビン基質分解活性」を測定することが出来る。

【0020】

本発明のトロンビン誘導体の活性は、野生型トロンビンに比べて低いレベルである事が望ましい。具体的には100万分の1以下、さらに望ましくは1000万分の1以下に低下していることが望ましい。トロンビンの生理的条件下における蛋白質基質活性化におけるk_{cat}値は約100sec⁻¹ほどにもなり、他多くの基質に対しても同等のk_{cat}値を示す。ラット投与実験におけるアンヒドロトロンビン生体内薬効半減期は1時間以内であり、1000万分の1以下であれば抗血栓、抗炎症効果を目的としてトロンビン誘導体を投与した際、数時間にわたって蛋白性のトロンビン基質と結合した場合にもトロンビン誘導体のトロンビン基質分解活性が問題となることがないと考えられる。

【0021】

より具体的には、本発明のトロンビン誘導体は、例えば、実施例で示すような生理的条件下、3時間、フィブリノゲン、血液凝固第13因子、トロンビンレセプターなどのトロンビン蛋白質基質と混合し反応させた場合の該基質の分解が10%以下のものを挙げることができる。上記条件であれば生体への投与後、本誘導体が代謝されるまでの間の本誘導体によるトロンビン基質活性化は問題にならないと考えられる。

【0022】

本発明のトロンビン誘導体は、通常の遺伝子変異導入法によってトロンビンの変異体をコードするDNAを作製し、該DNAを哺乳動物細胞などで発現させることによって得られる変異体の中から基質分解活性が低下し、かつ、ヒルジン基質に対する結合能を保持しているものを選択することによって取得することができる。

【0023】

本発明の1個又は数個のアミノ酸を置換して得られるトロンビン誘導体は、抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において、実質的にトロンビン基質分解活性を喪失しており、且つ基質結合能を野生型トロンビンと同等に保持していれば特に制限されるものではないが、具体的には、B鎖の205番目のセリン（B鎖205；配列番号2の254番目のセリンに相当するセリン）、203番目のグリシン（B鎖203；配列番号2の252番目のグリシンに相当するグリシン）、43番目のヒスチジン（B鎖43；配列番号2の92番目のヒスチジンに相当するヒスチジン）、および99番目のアスパラギン酸（B鎖99；配列番号2の148番目のアスパラギン酸に相当するアスパラギン酸）から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸が置換されたトロンビン誘導体であることが好ましく、より好ましくは、B鎖の203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラ

ギン酸から選ばれた少なくとも1つのアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体である。

【0024】

活性中心であるB鎖205番目のセリンは、その置換によってエクソサイトIの構造が破壊されてトロンビン基質結合能が損なわないようにするために、スレオニン、アラニン、グリシン、システインのいずれかに置換されていることが好ましく、アラニン、グリシンへの置換がより好ましい。B鎖203グリシンは、アラニン、セリン、スレオニンのいずれかに置換されている事が好ましい。B鎖99のアスパラギン酸は、アスパラギンに置換されていることが好ましい。B鎖43のヒスチジンは、アラニンまたはアスパラギンに置換されていることが好ましい。

【0025】

なお、本明細書中において、B鎖205、B鎖203等は、B鎖の1番目のアミノ酸（例えば、配列番号2のアミノ酸番号50のイソロイシン）から数えたアミノ酸番号を示している。なお、上記のような置換アミノ酸の位置はアミノ酸の欠失、挿入、付加などによって位置が前後することがある。例えば、N末端部に1つのアミノ酸残基が挿入されれば本来205番目のセリン残基は206番目となるが、そのような205番目のセリン残基に相当するセリン残基も、本発明においては205番目のセリン残基と呼ぶこととする。

【0026】

B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸のうち、置換される2つ以上のアミノ酸の組合せは特に制限されるものではないが、置換を受ける2つ以上のアミノ酸（置換部位）の組合せ、さらには、置換相手となるアミノ酸の種類により、基質結合能や抗血栓効果に違いが出ることがある。下記トロンビン誘導体1～5を例に用いて説明する。

【0027】

トロンビン誘導体1：置換部位がB鎖205番目のセリンと99番目のアスパラギン酸であり、セリンをアラニンに置換し、アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン誘導体（配列番号22のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体2：置換部位がB鎖205番目のセリンと43番目のヒスチジンであり、セリンをアラニンに置換し、ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン誘導体（配列番号26のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体3：置換部位がB鎖205番目のセリンと203番目のグリシンであり、セリンをグリシンに置換し、グリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体（配列番号8のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体4：置換部位がB鎖205番目のセリンと203番目のグリシンであり、セリンおよびグリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体（配列番号24のアミノ酸番号44～351の配列）。

トロンビン誘導体5：置換部位がB鎖205番目のセリン、203番目のグリシン、および99番目のアスパラギン酸であり、セリンおよびグリシンをアラニンに置換し、アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン誘導体（配列番号14のアミノ酸番号44～351の配列）。

【0028】

トロンビン誘導体1～5は何れも、ヒルジンゲルへの結合能を保持していたが、トロンビン誘導体4および5は、野生型トロンビンに比べ、ヘパリンゲルへの結合能が低下していた。

【0029】

トロンビン誘導体1～5は何れも抗血栓効果を有するものであるが、その効果の序列は下記の通りであった。

「トロンビン誘導体2 > トロンビン誘導体1、3 ≈ トロンビン誘導体4、5」

特に、トロンビン誘導体2は、後述のようなカルボキシル基修飾の有無に関わらず非常に高い抗血栓効果がみられた。また、トロンビン誘導体2にみられる抗血栓効果は、凝固力

スケードに対し特異的に作用するものであり、特に APTT を良く延長した。さらに、トロンビン誘導体 2 のカルボキシル基を修飾したトロンビン誘導体にみられる抗血栓効果は、凝固カスケード、血小板凝集、および血小板粘着抑制作用によってもたらされるものであった。

トロンビン誘導体 2 および 4 は、共に 205 番目のセリンをアラニンに置換したものであるが、前述のようにその抗血栓効果には大きな違いが見られた。トロンビン誘導体 3 および 4 も、共に 203 番目のグリシンをアラニンに置換したものであるが、やはりその抗血栓作用には前述のような違いが見られた。

本発明の各種トロンビン誘導体は、目的によって使い分ける事が可能である。例えば、トロンビン誘導体 2 は静脈内におけるフィブリン血栓（赤色血栓）に対し効果的である事が予測され、トロンビン誘導体 2 のカルボキシル基修飾体は、動脈内の血小板血栓（白色血栓）に対しても効果的である事が予想される。

本発明は主にトロンビンの活性中心の変異体によって得られる抗血栓作用を持ったトロンビン誘導体に関するものである。本発明において、ヘパリン結合能の低下という現象は、活性中心の変異によるトロンビン分子全体の構造変化が原因であると推察される。活性中心を本発明で開示されるような最適な組み合わせで変異させた上で、目的に応じ、さらなる組換え体として積極的にエクソサイト II に位置するアミノ酸を置換する事によってヘパリン親和性を低下させたトロンビン誘導体を得ることも可能である。

【0030】

なお、B鎖 99 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン誘導体は、CHO細胞を用いた発現実験では全発現量の 30% 程度はエカリンによって活性化されない異常タンパク質となった。

【0031】

本発明のトロンビン誘導体は、上記置換に加えて、さらに、ナトリウム結合部位が置換されたトロンビン誘導体であってもよい。ナトリウム結合部位とは Biochemistry 1992 年、31巻、p11721-11730 に開示された部位をいう。この中では B鎖 232 又は B鎖 234 のアスパラギン酸（配列番号 2 の 281 又は 283 番目のアスパラギン酸に相当するアスパラギン酸）が好ましい。これらのアスパラギン酸は両方が置換されてもよい。また、これらのアスパラギン酸は、アラニンもしくはアスパラギンに置換されることが好ましい。

【0032】

本発明のトロンビン誘導体は、上記置換に加えて、さらなる置換によってトロンボモジュリン結合能を特異的に低下した誘導体であることが好ましい。トロンボモジュリン結合能を選択的に低下させることで、本発明のトロンビン誘導体が生体内に投与された場合にトロンボモジュリンに結合し、本来生体内で機能するべきトロンビンのプロテイン C 活性化を抑制することを防ぐことができる。

【0033】

トロンボモジュリン結合能を特異的に低下させる置換は特に限定されるものではないが、B鎖 77 番目のリシン（B鎖 77；配列番号 2 の 126 番目のリシンに相当するリシン）を他のアミノ酸に置換することが好ましい。リシンを置換するアミノ酸は特に限定されるものではないが、アラニンまたはグルタミン酸であることが好ましい。

【0034】

本発明のトロンビン誘導体は、ヒルジン C 末端ペプチドへの結合能が野生型トロンビンの 1% 以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの 100 万分の 1 以下である限りにおいて、上述した置換されるアミノ酸以外のアミノ酸において、1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されたアミノ酸配列を有する誘導体であってもよい。なお、ここで数個とは、2 ~ 20 個、好ましくは 2 ~ 10 個、より好ましくは 2 ~ 5 個を意味する。また、ヒルジン C 末端ペプチドへの結合能が野生型トロンビンの 1% 以上、かつトロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの 100 万分の 1 以下である限りにおいて、配列番号 2 のアミノ酸配列と全体として一定以上の相同性、すなわち、80% 以上、好ましくは 90% 以上、特に好ましくは 95% 以上の相同性を有する範囲で改変されたもの

であってもよい。

【0035】

上記のようなトロンビン誘導体は部位特異的変異導入法により各誘導体をコードするDNAを作製し、該DNAを哺乳動物細胞などで発現させることによって得られる。このようなDNAは上述したようにA鎖及びB鎖の両方をコードするものであってもよいし、各鎖をそれぞれ発現させてもよい。部位特異的変異導入法は特に限定されるものではないが、例えば、市販のQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit（ストラタジーン社製）などを用いて行っても良い。また、化学合成によってトロンビン誘導体を得ることもできる。

【0036】

本発明のトロンビンはさらに、上記の誘導体のカルボキシル基が修飾されたものであってもよい。この場合、カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾されたものが好ましい。カルボキシル基が修飾されることによって、フィブリノゲンに対する結合能が低下するため、トロンビンレセプターなどの基質に対する選択性が増し、より少量で抗血栓効果を達成することができる。トロンビン誘導体のカルボキシル基の修飾は、例えは、国際公開02/077031号パンフレットに記載の方法に基いて行うことができる。

【0037】

本発明はまた、上述したようなトロンビン誘導体をコードするDNAを提供する。このようなDNAとしては、例えは、配列番号7、13、21、23、25または27の塩基番号130～1056の塩基配列を含むDNAなどを例示することができる。また、上述したようなトロンビン誘導体をコードする限りにおいて、配列番号7の塩基番号130～1056の塩基配列を含むDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするものであってもよい。ここで、ストリンジエントな条件としては、例えは、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60°C、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度で、1回より好ましくは2～3回洗浄する条件が挙げられる。

【0038】

本発明のトロンビン誘導体は抗血栓作用を有している。この作用は、例えは、実施例に示すような血漿の部分活性化トロンボプラスチン時間（APTT）測定や全血凝固時間測定によって確認することができる。本発明のトロンビン誘導体を製剤学的に許容される製剤担体と組合わせることにより、医薬組成物として使用することができる。ここで、医薬組成物として好ましくは、抗血栓治療薬、抗炎症剤、血小板凝集抑制剤、血小板粘着抑制剤、トロンビンレセプター活性化抑制剤などを挙げることができる。上記製剤担体は製剤学的に許容されるものであれば特に制限されないが、通常の薬剤に汎用される注射剤用溶剤、安定剤、希釈剤、界面活性剤等を使用できる。本発明の医薬組成物の投与単位形態は特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択できる。例えは、注射剤等を例示できる。本発明の医薬組成物の投与量は、症状などに応じて適宜選択される。

【実施例】

【0039】

以下実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はその趣旨を超えない限り、この実施例の範囲には限定されない。

【0040】

<1>トロンビン基質分解活性の測定

方法A：合成基質S2238（シグマ社）を基質とし、50mMトリス塩酸（pH8）、37°Cにおける405nMの吸光度の増加による測定をおこなった。

被験サンプル（ヒト野生型トロンビンまたはトロンビン誘導体）の50mM トリス塩酸 0.1M NaCl溶液（pH7.4、ヒト野生型トロンビンの場合の濃度は1μg/ml、トロンビン誘導体の場合の濃度は200μg/ml）と、合成基質S2238の50mM トリス塩酸 0.1M NaCl溶液（pH7.4）を、それぞれ200μlずつエッペンチューブに加え、37°C、12時間インキュベーションした。反応停止は50%酢酸 200μlを添加して行った。

なお、合成基質S2238の50mM トリス塩酸 0.1M NaCl溶液（pH7.4）と、50mM トリス塩酸 0.1M NaCl pH7.4を、それぞれ200μlずつエッペンチューブに加

え、37°C、12時間インキュベーションしたものをコントロールとした。

12時間インキュベーションした後のコントロールの吸光度は、インキュベーション前に比べて0.005増加した。被験サンプルの12時間インキュベーション終了後の吸光度の増加が、インキュベーション前の吸光度に比べて0.025以下の場合は測定限界以下であると判定した。

方法Aにおいて活性が認められないレベルに活性が低下したトロンビンに関しては、さらに以下の方法B又はC又はDいずれかの活性測定を行った。

【0041】

方法B：50mM トリス塩酸 0.1M NaCl pH7.4に透析した血液凝固XIII因子の50mM トリス塩酸 0.1M NaCl溶液 (pH7.4) と、被験サンプル (トロンビン誘導体) の50mM トリス塩酸 0.1M NaCl溶液 (pH7.4) を、それぞれ100μlずつエッペンチューブに加え、37°C、3時間インキュベーションした。50%酢酸 200μlを添加して反応を停止した後、SDS-PAGEによって血液凝固XIIIの活性化の有無を確認した。目視で分解産物が確認される場合にSDSPAGEを-SH条件下で行いXIIIのA鎖及び活性化A鎖のバンドの濃さをライトキャプチャー (アトー株式会社) を用い解析比較した。

【0042】

方法C：50mM トリス塩酸 0.1M NaCl pH7.4に溶解した1mg/ml フィブリノゲン溶液 200μlに、0.3mg/mlに調整された被験サンプル (トロンビン誘導体) を100μl添加し良く混和したのち、37°C、3時間のインキュベーションを行った。3時間後のクロット形成の有無を目視によって判断した。

【0043】

方法D：50mM トリス塩酸 0.1M NaCl pH7.4に溶解した0.1mg/ml トロンビンレセプター細胞外ドメインペプチド (配列番号4) 溶液 200μlに、0.3mg/mlに調整された被験サンプル (トロンビン誘導体) を100μl添加し 良く混和したのち、37°C 3時間のインキュベーションを行った。50%酢酸 200μlを添加して反応を停止した後、SDS-PAGEによってトロンビンレセプターの活性化の有無を確認した。目視で分解産物が確認される場合にSDSPAGEを-SH条件下で行いトロンビンレセプターの分解産物のバンドの濃さをライトキャプチャー (アトー株式会社) を用い解析比較した。

【0044】

<2>基質結合能の測定法

方法E：ヒルジンC末端ペプチド (配列番号3) への結合性の確認

(1) ヒルジンC末端ペプチドゲルの作製

ヒルジンC末端ペプチド 10mgを0.1M NaHCO₃緩衝液に溶解し、同緩衝液に置換したNHS活性化セルロファイン (チッソ社) 10mlを加え混和し30分間 25°Cにて攪拌した。

ここに1Mトリス塩酸 pH8 25°C 20mlを加え更に30分間 攪拌しヒルジンC末端ペプチド固定化ゲルを得た。同ゲルを50mM トリス塩酸 0.15M NaCl, pH7.4, 25°Cで平衡化した後、0.1M NaHCO₃緩衝液で透析した各トロンビン誘導体を添加し 30mlの0.1M NaHCO₃緩衝液で洗浄した。

(2) ヒルジンC末端ペプチド (配列番号3) への結合性の確認

ヒト野生型トロンビンもしくはトロンビン誘導体を含有する分画の2mlを、50mM トリス塩酸 0.15M NaCl pH8 4°Cに平衡化したヒルジンC末端ペプチドカラム 10mlに添加し、30mlの50mM トリス塩酸緩衝液で洗浄後、50mM トリス塩酸 1M NaCl 1M グアニジン塩酸 pH8で溶出した。抗ヒトトロンビンモノクローナル抗体を用いたウェスタンプロットティングにより素通り分画、および溶出分画のトロンビンを確認した。なお、本実験では50%以下の担体への結合の誘導体は基質結合能を喪失していると判断した。

【0045】

方法F：バイオセンサー (IASys日製産業) を用いたトロンビン誘導体のトロンビンレセプター結合能の測定

(1) トロンビン誘導体固定化キュベットの作製

被験サンプル（トロンビン誘導体） 0.1ml 0.1mg/ml 10mM NaHCO₃ pH8 を、NHS活性化CMデキストランキュベット（日製産業社）10分間 25°Cで搅拌することにより、被験サンプル（トロンビン誘導体）をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、トロンビン誘導体固定化キュベットを得た。引き続き 1M エタノールアミン pH8を0.2ml加えプロツキング処理を行った。

(2) 約1000、500、200、100、50、25、10nMに調整した トロンビンレセプター細胞外ドメインペプチド（配列番号4）の50mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl 溶液 (pH7.4) 0.1mlを、(1) で得られたトロンビン誘導体固定化キュベットに加え結合曲線を解析した。解析はFAST fit（日製産業）を用い同社マニュアルに順じて行った。

【0046】

[実験例1]

(1) ヒト野生型トロンビンの発現

ヒト野生型トロンビンのA鎖及びB鎖を含むDNA（配列番号5）をベクターに挿入しCHO細胞にトランスフェクションし、プレトロンビン生産細胞を得た。同プレトロンビン生産細胞をCD-CHO培地2リットルで10日間培養した。得られたプレトロンビン生産細胞の培養液2リットルを20リットルの10mM PIPES緩衝液pH7 4°Cに6時間ずつ2回透析したのち、CMセルロファイン（チッソ社）500mlに添加し、10mM PIPES緩衝液pH7

1リットルにて洗浄した。次に、10mM PIPES緩衝液pH7 0~1M NaClの直線的濃度勾配にて溶出を行った。溶出液を各25mlずつの分画に分け、それぞれを抗ヒトトロンビンポリクローナル抗体（コスモバイオ社）を用いたウェスタンブロッティングによって確認したところ、ヒト野生型トロンビンは約0.4Mで溶出された。

【0047】

(2) ヒト野生型トロンビンのエカリンによる活性化及び活性化ヒト野生型トロンビンのヒルジンC末端ペプチドカラム結合性の確認

得られたヒト野生型トロンビンを5mg含む分画約100mlを2リットルの50mMトリス塩酸緩衝液、0.15M NaCl、5mM CaCl₂ pH8溶液に透析した後 エカリン（シグマ社）100unitsを加え 37°C 24時間インキュベーションした。エカリン処理後の一一部を用い方法C記載のヒルジンE末端結合実験を行ったところ、素通り分画にはトロンビンは確認できず、溶出分画にトロンビンのバンドが確認された。

【0048】

(3) ヒト野生型トロンビンの精製

次にヒルジンC末端結合実験に使用した残りのエカリン活性化後のトロンビンを含む溶液98mlを、50mM トリス塩酸緩衝液、0.1M NaCl、pH8で平衡化した硫酸化セルロファインカラム（チッソ社）200mlに添加し、同緩衝液200mlで同カラムを洗浄した後、50mM トリス塩酸緩衝液、1M NaCl、pH8にて溶出した。さらに溶出液を50mM トリス塩酸緩衝液、0.1M NaCl、pH8に透析し 同緩衝液で平衡化されたヒルジンC末端ペプチドカラム（ヒルジンC末端ペプチドを200mg、NHS活性化セルロファイン（チッソ社）を30mlとした以外は、前述の「方法C：ヒルジン、(1)ヒルジンC末端ペプチドゲルの作製」に記載の方法に準じて作製した）30mlに添加した。50mM トリス塩酸緩衝液150mlで該ヒルジンC末端ペプチドカラムを洗浄した後、50mM トリス塩酸緩衝液、1M NaCl 1M グアニジン塩酸 pH8にて溶出し、SDSPAGE上ほぼ純化されたヒルジン結合性のヒト野生型トロンビン 約5mgを得た。

【0049】

[実験例2]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをグリシンに置換したトロンビン（以下203A205Gトロンビン）の発現

203A205GトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203A205Gトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号7に示す。

【0050】

203A205Gトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に

準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じて硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上でほぼ純化された203A205Gトロンビンが約5mg得られた。

【0051】

(2) 203A205Gトロンビンの基質分解活性測定

(1) で得られた203A205Gトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、203A205Gトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、XIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

さらに、203A205Gトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Cに従って測定した結果、クロット形成は確認されなかった。

【0052】

(3) 203A205Gトロンビンのトロンビンレセプターへの結合能の確認

(1) で得られた203A205Gトロンビンのトロンビンレセプターへの結合能を、前述の方法Fに従って測定した。203A205Gトロンビンのトロンビンレセプターの解離定数は3.2μMであった。

【0053】

(4) カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)及びプロトロンビン時間(PT)の測定

1mg/5mlの203A205Gトロンビン/50mMリン酸緩衝液 0.5M NaCl pH 6.5を0.2Mグリシンエチルエステル 0.5M NaCl pH 6.5に室温で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(和光純薬)を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて1時間インキュベーションし、203A205Gトロンビンのカルボキシル基を修飾した。

APTT測定：修飾された203A205Gトロンビン500μgを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH 7.4 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:10の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH 7.4を、標準血漿(国際試薬社)に1:10(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは38秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205GトロンビンのAPTTは65秒であった。

PTの測定：修飾された203A205Gトロンビン500μgを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH 7.4 1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:10の割合となるように添加し、PTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH 7.4を、標準血漿(国際試薬社)に1:10(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALCIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは20秒であったのに対しカルボキシル基修飾203A205GトロンビンのPTは21秒であった。

【0054】

(5) PRP(多血小板血漿：platelet rich plasma)を用いたカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの抗血小板機能の評価

評価(1)：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2500rpmで10分遠心分離することによりPPP(乏血小板血漿：platelet poor plasma)を得た。100μl添加した場合にカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの終濃度が37μg/mlとなるように濃度が調整された、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの5mMリン酸緩衝液 0.15M NaCl(pH 7.4)溶液100μlをPRP130μlに添加し、血小板凝集惹起物質として5mg/mlリストセチン5mMリン酸緩衝液 0.15M NaCl(pH 7.4)溶液35μlを添加した。コントロールとして、PRP130μlに5mMリン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH 7.4 100μlを添加し透過率の経時変化を

記録した。なお、透過率（波長700nm）の測定はEASY TRACER ET-800（東京光電株式会社）を用いて行った。結果を図1に示す。なお、縦軸の透過率は血小板凝集能と正の相関を示す値である。

評価（2）：血小板凝集惹起物質として $1\mu\text{g}/\text{ml}$ カルボキシル基修飾トロンビン（ヒト野生型） 5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH 7.4) 溶液を用いた以外は、評価（1）の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP $130\mu\text{l}$ に、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH 7.4 100 μl を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800（東京光電株式会社）を用いて行った。結果を図2に示す。

図1、図2より、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを用いることによって血小板凝集が低下したことから、該トロンビン誘導体は抗血小板効果を示すことがわかった。

【0055】

以上の結果から、203A205Gトロンビンは、活性が検出限界以下に低下しているが、基質への結合能は保持していることがわかった。また、APTTの結果および血小板凝集抑制実験の結果から、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンは十分な抗血栓効果、抗血小板効果を有していることがわかった。

【0056】

[実験例3]

(1) B鎖205セリンをアラニンに置換したトロンビン（以下205Aトロンビン）の発現

205AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号9に示す。

【0057】

205Aトロンビンを実施例1の(1)の方法に準じて発現させた。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実施例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上 ほぼ純化された205Aトロンビンが約6mg得られた。

【0058】

(2) 205Aトロンビンの基質分解活性測定

(1) で得られた205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、205Aトロンビンの基質分解活性は、ヒト野生型トロンビンに比較し約 3×10^{-5} の活性であった。

さらに、205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、90%以上のXIIIのA鎖は活性化されていた。

【0059】

(3) 205Aトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定

205Aトロンビン $500\mu\text{g}$ を、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH 7.4 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH 7.4を、標準血漿（国際試薬社）に1:1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、205AトロンビンのAPTTは95秒であった。

以上より、205Aトロンビンは活性が残存しており、1分から数分の間に測定するAPTTにおいては抗血栓効果を示すが残存活性試験より生体に投与した場合、205Aトロンビンが代謝されるまでの時間にトロンビン基質を分解してしまう事が予想された。

【0060】

[実験例4]

(1) B鎖205セリンをスレオニンに置換したトロンビン（以下205Tトロンビン）の発現

205TトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Tトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号11に示す。

【0061】

205Tトロンビンを実施例1の(1)の方法で発現させた。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実施例1の(3)の方法に準じて硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上 ほぼ純化された205Tトロンビンが約5m g得られた。

【0062】

(2) 205Tトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205Tトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、205Tトロンビンの基質分解活性は、ヒト野生型トロンビンに比較し約 2.5×10^{-4} の活性であった。

さらにトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、ほぼ全てのXIIIのA鎖は野生型トロンビン同様の活性化を受け、分解された活性化血液凝固XIII因子のバンドが確認された。以上より、205Tトロンビンは活性が残存していることがわかった。

【0063】

[実験例5]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン(203A205A99Nトロンビン)の発現

203A205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203A205A99Nトロンビン塩基配列を配列番号13に示す。

【0064】

203A205A99Nトロンビンを実施例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実施例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上 ほぼ純化された203A205A99Nトロンビンが約5m g得られた。

【0065】

(2) 203A205A99Nトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた203A205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、203A205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、XIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

【0066】

(3) 203A205A99Nトロンビン添加血液のAPTTの測定

203A205A99Nトロンビン100 μ gを5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4 1m lに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4を、標準血漿(国際試薬社)に容量比1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、203A205A99NトロンビンのAPTTは60秒であった。

以上より、203A205A99Nトロンビンはヒルジンゲルへの結合能を有し且つ、活性が十分に低下しているものも十分な抗血栓効果を有していないことがわかった。

【0067】

[実験例6]

(1) B鎖205セリンをバリンに置換したトロンビン(以下205Vトロンビン)の発現

205VトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Vトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号15に示す。

【0068】

205Vトロンビンを実施例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じ

てヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Vトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

【0069】

[実験例7]

(1) B鎖205セリンをアスパラギン酸に置換したトロンビン(以下205Dトロンビン)の発現

205DトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Dトロンビン塩基配列を配列番号17に示す。

【0070】

205Dトロンビンを実施例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Dトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

【0071】

[実験例8]

(1) B鎖205セリンをアスパラギンに置換したトロンビン(以下205Nトロンビン)の発現

205NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Nトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号19に示す。

【0072】

205Nトロンビンを実施例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Nトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

【0073】

[実験例9]

国際公開第01/03740号パンフレットの実施例1記載のアンヒドロトロンビンのトロンビンレセプター結合能の測定を、方法Dにより測定したところ、該アンヒドロトロンビンとトロンビンレセプターの解離定数は1.2μMであった。

【0074】

[実験例10]

(1) B鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン(205A99Nトロンビン)の発現

205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。

205A99Nトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号21に示す。

【0075】

205A99Nトロンビンを実施例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実施例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205A99Nトロンビンが約5.5mg得られた。

【0076】

(2) 205A99Nトロンビンの基質分解活性測定

(1) で得られた205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、XIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

【0077】

(3) 205A99Nトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定

205A99Nトロンビン100 μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4を、標準血漿（国際試薬社）に1:1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、205A99NトロンビンのAPTTは75秒であった。以上より205A99Nトロンビンは十分な抗血栓能を有していることが分かった。

【0078】

[実験例11]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンに置換したトロンビン（203A205Aトロンビン）の発現

203A205AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203A205Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号23に示す。

【0079】

203A205Aトロンビンを実施例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実施例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された203A205Aトロンビンが約4mg得られた。

【0080】

(2) 203A205Aトロンビンの基質分解活性測定

(1) で得られた203A205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、203A205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、XIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

203A205AトロンビンはヒルジンC末端ペプチド結合性を有し且つ十分に活性を失っていることが分かった。

203A205Aトロンビン100 μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4を、標準血漿（国際試薬社）に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、203A205AトロンビンのAPTTは59秒であった。

【0081】

[実験例12]

(1) B鎖205セリンをアラニンに、B鎖43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン（205A43Aトロンビン）の発現

205A43AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A43Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号25に示す。

【0082】

205A43Aトロンビンを実施例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実施例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205A43Aトロンビンが約5mg得られた。

(2) 205A43Aトロンビンの基質分解活性測定

(1) で得られた205A43Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

205A43Aトロンビン25 μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定

した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4を、標準血漿（国際試薬社）に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは48秒であったのに対し、205A43AトロンビンのAPTTは132秒であった。

【0083】

(3) 205A43Aトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）及びプロトロンビン時間（PT）の測定

APTTの測定：205A43Aトロンビン25 μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4を、標準血漿（国際試薬社）に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは48秒であったのに対し、205A43AトロンビンのAPTTは132秒であった。

PTの測定：205A43Aトロンビン25 μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4を、標準血漿（国際試薬社）に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは24秒であったのに対し、205A43AトロンビンのPTは25秒であった。

【0084】

(4) カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）の測定

1mg/5mlの205A43Gトロンビン/50mMリン酸緩衝液 0.5M NaCl pH6.5を0.2Mグリシンエチルエステル 0.5M NaCl pH6.5に室温で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(和光純薬)を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25℃にて1時間インキュベーションし、205A43Aトロンビンのカルボキシル基を修飾した。

修飾された205A43Aトロンビンを5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4 1mlに溶解したものを、標準血漿（国際試薬社）に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl pH7.4を、標準血漿（国際試薬社）に1:1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは48秒であったのに対し、修飾205A43AトロンビンのAPTTは125秒であった。

【0085】

PRPを用いた205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価（1）：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2500rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100 μ l添加した場合に205A43Aトロンビンの終濃度が、30 μ g/mlになるように濃度が調製された、205A43Aトロンビンの5mMリン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液を、100 μ lずつPRP130 μ lに添加し、惹起物質として5mg/mlリストセチン5mMリン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液35 μ lを添加した。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mMリン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図3に示す。

評価（2）：惹起物質として1 μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン5mMリン酸緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価（1）の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ lに、5mMリン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100 μ lを添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図4に示す。

【0086】

PRPを用いたカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価（1）：採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2

mlを得た。さらに2500rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。100μl添加した場合、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの終濃度が、それぞれ30μg/ml、15μg/ml、7.5μg/mlになるように濃度が調製された、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの5mMリン酸緩衝液0.15M NaCl(pH7.4)溶液3種類を、それぞれ100μlずつPRP130μlに添加し、惹起物質として5mg/mlリストセチン5mMリン酸緩衝液0.15M NaCl(pH7.4)溶液35μlを添加した。コントロールとして、PRP130μlに、5mMリン酸緩衝液0.15M NaCl、pH7.4 100μlを添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800(東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図5～7に示す。

評価(2)：惹起物質として1μg/mlカルボキシル基修飾トロンビン5mMリン酸緩衝液0.15M NaCl(pH7.4)溶液を用いた以外は、評価(1)の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130μlに、5mMリン酸緩衝液0.15M NaCl、pH7.4 100μlを添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800(東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図8～10に示す。

【0087】

以上の結果から、205A43Aトロンビン誘導体は化学修飾の有無に関わらず抗血栓能を有したが、抗血小板作用については修飾の有無によって効果に差があった。したがって、205A43Aトロンビン誘導体はAPTTを中心とした血液凝固に主に作用し、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン誘導体はAPTTと共に抗血小板能を有する事が分かった。

【0088】

【実験例13】

203A205G77Eトロンビンのトロンボモジュリン結合能の確認

(1) B鎖203グリシンをアラニンに、B鎖205セリンをグリシンに、B鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン(203A205G77Eトロンビン)の発現

203A205G77EトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203A205G77Eトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号27に示す。

【0089】

203A205G77Eトロンビンを実施例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実施例1の(3)の方法に準じて硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上でほぼ純化された203A205G77Eトロンビンが約5mg得られた。

【0090】

203A205Gトロンビン誘導体の0.1mg/ml 10mM NaHCO₃ pH8溶液、および203A205G77Eトロンビン誘導体の0.1mg/ml 10mM NaHCO₃ pH8溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25℃で搅拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、203A205Gトロンビン固定化キュベットおよび203A205G77Eトロンビン固定化キュベットを得た。両キュベットには約5000arcの蛋白質が固相化された。引き続き1MエタノールアミンpH8を0.2ml加えプロッキング処理を行った。

203A205Gトロンビン固定化キュベットおよび203A205G77Eトロンビン固定化キュベットそれぞれに、200nMの可溶性トロンボモジュリン溶液(コスモバイオ)(50mMリン酸緩衝液、0.15M NaCl、pH7.4に溶解)を100μl加えたところ、3分後203A205Gトロンビン固相化キュベットには400arc secのトロンボモジュリンが吸着され、203A205G77Eトロンビン固相化キュベットには20arc secのトロンボモジュリンが吸着された。

【0091】

以上よりB鎖77リシンのグルタミン酸への置換により、トロンボモジュリン親和性が約1/20に低下している事が分かった。

【産業上の利用可能性】

【0092】

本発明のトロンビン誘導体は、抗血栓剤、抗炎症剤などの医薬として好適に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】 $5\text{ mg}/\text{m l}$ リストセチンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン ($37\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。009がコントロールを、010がカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを示す。縦軸が透過率(%)、横軸が時間(分)を示す(図2～10も同じ)。

【図2】 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン ($37\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。002がコントロールを、001がカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを示す。

【図3】 $5\text{ mg}/\text{m l}$ リストセチンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、205A43Aトロンビン ($30\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。079がコントロールを、080が205A43Aトロンビンを示す。

【図4】 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、205A43Aトロンビン ($30\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。083がコントロールを、084が205A43Aトロンビンを示す。

【図5】 $5\text{ mg}/\text{m l}$ リストセチンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($30\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。056がコントロールを、055がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図6】 $5\text{ mg}/\text{m l}$ リストセチンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($15\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。042がコントロールを、041がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図7】 $5\text{ mg}/\text{m l}$ リストセチンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($7.5\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。058がコントロールを、057がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図8】 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($30\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。064がコントロールを、063がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図9】 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($15\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。067がコントロールを、066がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【図10】 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$ カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したP R Pに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン ($7.5\text{ }\mu\text{g}/\text{m l}$) の抗血小板効果を示す図。070がコントロールを、069がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Chisso Corporation
FUJIMORI KOGYO Co., Ltd.

<120> トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物

<130> P-C40646

<150> JP 2004/080950

<151> 2004-03-19

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 927

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(927)

<223>

<400> 1

acc gcc acc agt gag tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc 48
Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly
1 5 10 15

t cg gga gag gca gac tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag t cg 96
Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser
20 25 30

ctg gag gac aaa acc gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg 144
Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly
35 40 45

cgc att gtg gag ggc tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag 192
Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln
50 55 60

gtg atg ctt ttc cgg aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc 240
Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser
65 70 75 80

ctc atc agt gac cgc tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac 288
Leu Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr

85

90

95

ccg ccc tgg gac aag aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att 336
 Pro Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile
 100 105 110

 ggc aag cac tcc cgc aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc 384
 Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser
 115 120 125

 atg ttg gaa aag atc tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac 432
 Met Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn
 130 135 140

 ctg gac cgg gac att gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc 480
 Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe
 145 150 155 160

 agt gac tac att cac cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc 528
 Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala
 165 170 175

 agc ttg ctc cag gct gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac 576
 Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn
 180 185 190

 ctg aag gag acg tgg aca gcc aac gtt ggt aag ggg cag ccc agt gtc 624
 Leu Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val
 195 200 205

 ctg cag gtg gtg aac ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac 672
 Leu Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp
 210 215 220

 tcc acc cgg atc cgc atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag 720
 Ser Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys
 225 230 235 240

 cct gat gaa ggg aaa cga ggg gat gcc tgt gaa ggt gac agt ggg gga 768
 Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly
 245 250 255

 ccc ttt gtc atg aag agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc 816
 Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly
 260 265 270

 atc gtc tca tgg ggt gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc 864
 Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe
 275 280 285

tac aca cat gtg ttc cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat 912
Tyr Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp
290 295 300

cag ttt gga gag tag 927
Gln Phe Gly Glu
305

<210> 2
<211> 308
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly
1 5 10 15

Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser
20 25 30

Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly
35 40 45

Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln
50 55 60

Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser
65 70 75 80

Leu Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr
85 90 95

Pro Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile
100 105 110

Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser
115 120 125

Met Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn
130 135 140

Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe
145 150 155 160

Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala
165 170 175

Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn

180

185

190

Leu Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val
 195 200 205

Leu Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp
 210 215 220

Ser Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys
 225 230 235 240

Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly
 245 250 255

Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly
 260 265 270

Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe
 275 280 285

Tyr Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp
 290 295 300

Gln Phe Gly Glu
 305

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Asp Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu
 1 5 10

<210> 4

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Arg Pro Glu Ser Lys Ala Thr Asn Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ser
 1 5 10 15

Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp
 20 25 30

Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly Leu Thr Glu Tyr Arg Leu Val Ser Ile
35 40 45

Asn Lys Ser Ser Pro Leu Gln Lys Gln Leu Pro Ala Phe Ile Ser Glu
50 55 60

Asp Ala Ser Gly Tyr Leu Thr Ser Ser
65 70

<210> 5

<211> 1056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1056)

<223>

<400> 5

atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
35 40 45

tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac 192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60

tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc 240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc 288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg 336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
115					120							125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
130					135					140						
aac	tcc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155				160		
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
					165				170				175			
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
					180			185				190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	tcc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
					195			200				205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
					210			215				220				
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
					225			230			235			240		
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
					245			250				255				
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
					260			265				270				
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
					275			280				285				
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggt	gac	agt	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
					290			295			300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	

305

310

315

320

gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc 1008
 Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
 325 330 335

cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag 1056
 Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
 340 345 350

<210> 6

<211> 351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
 85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
 100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
 115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
 130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
 145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
 165 170 175

Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile
180							185						190		
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His
195							200						205		
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala
210							215						220		
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp
225							230						235		
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn
								245					250		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg
								260					265		
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys
								275					280		
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys
								290					295		
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly
								305					310		
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe
								325					330		
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu	
								340					345		
													350		

<210> 7
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 7
 atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag	96
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
															20	
															25	
															30	
caa	gca	cgg	tcg	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag	144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
															35	
															40	
															45	
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac	192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
															50	
															55	
															60	
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
															65	
															70	
															75	
															80	
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
															85	
															90	
															95	
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
															100	
															105	
															110	
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
															115	
															120	
															125	
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
															130	
															135	
															140	
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
															145	
															150	
															155	
															160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
															165	
															170	
															175	
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
															180	
															185	
															190	
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
															195	
															200	
															205	
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	

210

215

220

gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg	720		
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp			
225	230	235	240
aca gcc aac gtt ggt aag ggg cag ccc agt gtc ctg cag gtg gtg aac	768		
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn			
245	250	255	
ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac tcc acc cgg atc cgc	816		
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg			
260	265	270	
atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag cct gat gaa ggg aaa	864		
Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys			
275	280	285	
cga ggg gat gcc tgt gaa gct gac ggt ggg gga ccc ttt gtc atg aag	912		
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Gly Gly Pro Phe Val Met Lys			
290	295	300	
agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt	960		
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly			
305	310	315	320
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc	1008		
Gl u Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe			
325	330	335	
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag	1056		
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu			
340	345	350	

<210> 8

<211> 351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala			
1	5	10	15
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln			
20	25	30	
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu			
35	40	45	

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
180 185 190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
195 200 205

Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
210 215 220

Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225 230 235 240

Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
245 250 255

Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
260 265 270

Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
275 280 285

Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
290 295 300

Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly

3 0 5

3 1 0

3 1 5

3 2 0

Gl u	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe
3 2 5							3 3 0							3 3 5	
Arg	Leu	Lys	Lys	Tr p	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu	
3 4 0					3 4 5								3 5 0		

<210> 9

<211> 1056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1056)

<223>

<400> 9

at g	g c g	c a c	g t c	c g a	g g c	t t g	c a g	c t g	c c t	g g c	t g c	c t g	g c t		4 8
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala
1				5				10					15		

g c c	c t g	t g t	a g c	c t t	g t g	c a c	a g c	c a t	g t g	t t c	c t g	g c t	c c t	c a g	9 6
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln
				20			25					30			

c a a	g c a	c g g	t c g	c t g	c t c	c a g	c g g	g t c	c g g	c a c	g c c	a c c	a g t	g a g	1 4 4
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu
				35			40			45					

t a c	c a g	a c t	t t c	t t c	a a t	c c g	a g g	a c c	t t t	g g c	t c g	g g a	g a g	g c a	g a c	1 9 2
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
				50			55			60						

t g t	g g g	c t g	c g a	c c t	c t g	t t c	g a g	a a g	a a g	t c g	c t g	g a g	g a c	a a a	a c c	2 4 0
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
					65			70			75		80			

g a a	a g a	g a g	c t c	c t g	g a a	t c c	t a c	g a c	g g g	c g c	a t t	g t g	g a g	g g c		2 8 8
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
					85			90			95					

t c g	g a t	g c a	g a g	a t c	g g c	a t g	t c a	c c t	t g g	c a g	g t g	a t g	c t t	t t c	c g g	3 3 6
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Tr p	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
					100			105			110					

a a g	a g t	c c c	c a g	g a g	c t g	c t g	t g t	g g g	g c c	a g c	c t c	a t c	a g t	g a c	c g c	3 8 4
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	

115

120

125

tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
130		135								140						
aac	tcc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145						150				155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
						165			170					175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
						180		185				190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
						195		200			205					
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
						210		215			220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
						225		230			235			240		
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
						245		250			255					
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
						260		265			270					
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
						275		280			285					
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggt	gac	gct	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
						290		295			300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
						305		310			315			320		

gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc 1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
325 330 335

cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag 1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
340 345 350

<210> 10
<211> 351
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile

180

185

190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
 195 200 205

Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
 210 215 220

Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
 225 230 235 240

Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
 245 250 255

Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
 260 265 270

Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
 275 280 285

Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
 290 295 300

Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
 305 310 315 320

Glut Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
 325 330 335

Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
 340 345 350

<210> 11

<211> 1056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1056)

<223>

<400> 11

atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln

20

25

30

caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag	35	40	45	144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu				
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac	50	55	60	192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp				
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc	65	70	75	240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr				
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc	85	90	95	288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly				
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg	100	105	110	336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg				
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc	115	120	125	384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg				
tgg gtc ctc acc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag	130	135	140	432
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys				
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc	145	150	155	480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg				
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc	165	170	175	528
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile				
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	180	185	190	576
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile				
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac	195	200	205	624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His				
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct	210	215	220	672
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala				

g a t a c a a g g g g c g g g t g a c a g g c t g g g g c a a c c t g a a g g a g a c g t g g	720		
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp			
225	230	235	240
a c a g c c a a c g t t g g t a a g g g g c a g c c c a g t g t c c t g c a g g t g g t g a a c	768		
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn			
245	250	255	
c t g c c c a t t g t g g a g c g g c c g g t c t g c a a g g a c t c c a c c c g g a t c c g c	816		
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg			
260	265	270	
a t c a c t g a c a a c a t g t t c t g t g c t g g t t a c a a g c c t g a t g a a g g g a a a	864		
Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys			
275	280	285	
c g a g g g g a t g c c t g t g a a g g t g a c a c t g g g g g a c c c t t t g t c a t g a a g	912		
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Thr Gly Gly Pro Phe Val Met Lys			
290	295	300	
a g c c c c t t t a a c a a c c g c t g g t a t c a a a t g g g c a t c g t c t c a t g g g g t	960		
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly			
305	310	315	320
g a a g g c t g t g a c c g g g a t g g g a a a t a t g g c t t c t a c a c a c a t g t g t t c	1008		
Gl u Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe			
325	330	335	
c g c c t g a a g a a g t g g a t a c a g a a g g t c a t t g a t c a g t t t g g a g a g t a g	1056		
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu			
340	345	350	

<210> 12
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala			
1	5	10	15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln			
20	25	30	

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu			
35	40	45	

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp	
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

50	55	60														
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70						75				80	
Glu	Arg	Glu	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly
					85					90				95		
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
						100			105				110			
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
						115			120				125			
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
						130			135				140			
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
						145			150				155		160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
						165				170				175		
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
						180			185				190			
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
						195			200				205			
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
						210			215				220			
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
						225			230				235		240	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
						245				250				255		
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
						260			265				270			
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
						275			280				285			
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
						290			295				300			
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
						305			310				315		320	

Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
325 330 335

Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
340 345 350

<210> 13

<211> 1056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1056)

<223>

<400> 13

atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
35 40 45

tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac 192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60

tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc 240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc 288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg 336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc 384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
130		135									140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145						150				155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
						165			170					175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	aac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asn	Ile	
						180		185				190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
						195		200			205					
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
						210		215			220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
						225		230			235			240		
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
						245		250			255					
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
						260		265			270					
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
						275		280			285					
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	gct	gac	gct	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
						290		295			300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
						305		310			315			320		
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	

325

330

335

cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag 1056
 Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
 340 345 350

<210> 14

<211> 351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
 85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
 100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
 115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
 130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
 145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
 165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asn Ile
 180 185 190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
 195 200 205
 Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
 210 215 220
 Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
 225 230 235 240
 Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
 245 250 255
 Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
 260 265 270
 Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
 275 280 285
 Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
 290 295 300
 Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
 305 310 315 320
 Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
 325 330 335
 Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
 340 345 350

<210> 15
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 15
 atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 gcc ctg tgt agc ctt gtc cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30

caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag	144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu	
35 40 45	
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac	192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp	
50 55 60	
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc	240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr	
65 70 75 80	
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc	288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly	
85 90 95	
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg	336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg	
100 105 110	
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc	384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg	
115 120 125	
tgg gtc ctc acc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag	432
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys	
130 135 140	
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc	480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg	
145 150 155 160	
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc	528
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile	
165 170 175	
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	576
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile	
180 185 190	
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac	624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His	
195 200 205	
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct	672
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala	
210 215 220	
gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg	720
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp	

225

230

235

240

aca gcc aac gtt ggt aag ggg cag ccc agt gtc ctg cag gtg gtg aac	768
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn	
245 250 255	
ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac tcc acc cgg atc cgc	816
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg	
260 265 270	
atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag cct gat gaa ggg aaa	864
Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys	
275 280 285	
cga ggg gat gcc tgt gaa ggt gac gtt ggg gga ccc ttt gtc atg aag	912
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Val Gly Gly Pro Phe Val Met Lys	
290 295 300	
age ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt	960
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly	
305 310 315 320	
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc	1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe	
325 330 335	
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag	1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu	
340 345 350	

<210> 16
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

〈400〉 16

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
180 185 190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
195 200 205

Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
210 215 220

Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225 230 235 240

Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
245 250 255

Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
260 265 270

Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
275 280 285

Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
290 295 300

Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305 310 315 320

Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
325 330 335

Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
340 345 350

<210> 17
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1056)
<223>

<400> 17
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

caa gca cgg tcg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
35 40 45

tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac 192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60

tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc 240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc 288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg 336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc 384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

tgg gtc ctc acc gcc gac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag 432
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys

130

135

140

aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145						150				155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
						165			170					175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
						180		185					190			
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
						195		200				205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
						210		215			220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
						225		230			235			240		
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
						245		250				255				
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
						260		265			270					
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
						275		280			285					
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggt	gac	gat	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Asp	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
						290		295			300					
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
						305		310			315			320		
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Glu	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
						325		330			335					

cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag 1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
340 345 350

<210> 18
<211> 351
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
180 185 190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
195 200 205

Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
210 215 220

Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225 230 235 240

Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
245 250 255

Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
260 265 270

Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
275 280 285

Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Asp Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
290 295 300

Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305 310 315 320

Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
325 330 335

Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
340 345 350

<210> 19

<211> 1056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1056)

<223>

<400> 19

atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu

aca gcc aac gtt ggt aag ggg cag ccc agt gtc ctg cag gtg gtg aac 768
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
245 250 255

ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac tcc acc cgg atc cgc 816
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
260 265 270

atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag cct gat gaa ggg aaa 864
Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
275 280 285

cga ggg gat gcc tgt gaa ggt gac aat ggg gga ccc ttt gtc atg aag 912
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Asn Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
290 295 300

agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt 960
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305 310 315 320

gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc 1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
325 330 335

cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag 1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
340 345 350

<210> 20
<211> 351
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
180 185 190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
195 200 205

Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
210 215 220

Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225 230 235 240

Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
245 250 255

Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
260 265 270

Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
275 280 285

Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Asn Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
290 295 300

Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305 310 315 320

Glut Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
325 330 335

Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu

340

345

350

<210> 21
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 21
 atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30
 caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 144
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45
 tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac 192
 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60
 tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc 240
 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80
 gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc 288
 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
 85 90 95
 tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg 336
 Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
 100 105 110
 aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc 384
 Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
 115 120 125
 tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag 432
 Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
 130 135 140

aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145						150				155					160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
						165			170					175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	aac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asn	Ile	
						180			185					190		
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
						195			200					205		
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
						210			215					220		
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
						225			230					235		240
aca	gcc	aac	gtt	gtt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
						245			250					255		
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
						260			265					270		
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
						275			280					285		
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggt	gac	gct	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
						290			295					300		
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
						305			310					315		320
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008
Gl	u	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe
						325			330					335		
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		

340

345

350

<210> 22
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
 85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
 100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
 115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
 130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
 145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
 165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asn Ile
 180 185 190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
 195 200 205

Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala

210

215

220

Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
 225 230 235 240

Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
 245 250 255

Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
 260 265 270

Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
 275 280 285

Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
 290 295 300

Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
 305 310 315 320

Gl u Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
 325 330 335

Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
 340 345 350

<210> 23

<211> 1056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1056)

<223>

<400> 23

atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15 48

gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30 96

caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45 144

tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tcg	gga	gag	gca	gac	192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
50					55					60						
tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65					70					75				80		
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
					85				90				95			
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
					100			105				110				
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
					115			120				125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
					130			135			140					
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
					145			150			155			160		
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
					165			170			175					
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
					180			185			190					
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
					195			200			205					
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
					210			215			220					
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
					225			230			235			240		
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	

245

250

255

ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac tcc acc cgg atc cgc 816
 Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
 260 265 270

atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag cct gat gaa ggg aaa 864
 Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
 275 280 285

cga ggg gat gcc tgt gaa gct gac gct ggg gga ccc ttt gtc atg aag 912
 Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
 290 295 300

agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt 960
 Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
 305 310 315 320

gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc 1008
 Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
 325 330 335

cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag 1056
 Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
 340 345 350

<210> 24
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
 20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
 35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
 50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
 65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly

85

90

95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
180 185 190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
195 200 205

Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
210 215 220

Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225 230 235 240

Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
245 250 255

Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
260 265 270

Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
275 280 285

Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
290 295 300

Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305 310 315 320

Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
325 330 335

Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
340 345 350

<210> 25
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1056)
<223>

<400> 25
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct 48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag 96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30
caa gca cgg tcg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag 144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
35 40 45
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac 192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc 240
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc 288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg 336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc 384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125
tgg gtc ctc acc gcc gcc tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag 432
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130 135 140
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc 480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg

145

150

155

160

aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	aag	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile		
						165				170					175		
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576	
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile		
							180				185				190		
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624	
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His		
							195				200				205		
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672	
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala		
							210				215				220		
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720	
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp		
							225				230				235		
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768	
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn		
							245				250				255		
ctg	ccc	att	gtg	gag	cgg	ccg	gtc	tgc	aag	gac	tcc	acc	cgg	atc	cgc	816	
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg		
							260				265				270		
atc	act	gac	aac	atg	ttc	tgt	gct	ggt	tac	aag	cct	gat	gaa	ggg	aaa	864	
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
							275				280				285		
cga	ggg	gat	gcc	tgt	gaa	ggg	gac	gcc	ggg	gga	ccc	ttt	gtc	atg	aag	912	
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys		
							290				295				300		
agc	ccc	ttt	aac	aac	cgc	tgg	tat	caa	atg	ggc	atc	gtc	tca	tgg	ggt	960	
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly		
							305				310				315		
gaa	ggc	tgt	gac	cgg	gat	ggg	aaa	tat	ggc	ttc	tac	aca	cat	gtg	ttc	1008	
Gl	u	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe	
							325				330				335		
cgc	ctg	aag	aag	tgg	ata	cag	aag	gtc	att	gat	cag	ttt	gga	gag	tag	1056	
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu			
							340				345				350		

<210> 26
<211> 351
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
180 185 190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
195 200 205

Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
210 215 220

Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
225					230				235				240			
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	Asn	
					245				250				255			
Leu	Pro	Ile	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Ile	Arg	
								265				270				
Ile	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
								275				280			285	
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	
								290				295			300	
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	
								305				310			315	
Gl	u	Gly	Cys	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Thr	His	Val	Phe
								325				330			335	
Arg	Leu	Lys	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Val	Ile	Asp	Gln	Phe	Gly	Glu		
								340				345			350	

<210> 27
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1056)
 <223>

<400> 27																
atg	gcg	cac	gtc	cga	ggc	ttg	cag	ctg	cct	ggc	tgc	ctg	gcc	ctg	gct	48
Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala	
1								5				10		15		
gcc	ctg	tgt	agc	ctt	gtg	cac	agc	cag	cat	gtg	ttc	ctg	gct	cct	cag	96
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
												20		25		30
caa	gca	cgg	tgc	ctg	ctc	cag	cgg	gtc	cgg	cga	acc	gcc	acc	agt	gag	144
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
												35		40		45
tac	cag	act	ttc	ttc	aat	ccg	agg	acc	ttt	ggc	tgc	gga	gag	gca	gac	192
Tyr	Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	

50

55

60

tgt	ggg	ctg	cga	cct	ctg	ttc	gag	aag	aag	tcg	ctg	gag	gac	aaa	acc	240
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
65		70						75					80			
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	tcc	tac	atc	gac	ggg	cgc	att	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	
		85						90					95			
tcg	gat	gca	gag	atc	ggc	atg	tca	cct	tgg	cag	gtg	atg	ctt	ttc	cgg	336
Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	
		100					105					110				
aag	agt	ccc	cag	gag	ctg	ctg	tgt	ggg	gcc	agc	ctc	atc	agt	gac	cgc	384
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	
		115					120					125				
tgg	gtc	ctc	acc	gcc	gcc	cac	tgc	ctc	ctg	tac	ccg	ccc	tgg	gac	aag	432
Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
		130					135					140				
aac	ttc	acc	gag	aat	gac	ctt	ctg	gtg	cgc	att	ggc	aag	cac	tcc	cgc	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
		145					150					155			160	
aca	agg	tac	gag	cga	aac	att	gaa	gaa	ata	tcc	atg	ttg	gaa	aag	atc	528
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	
						165			170				175			
tac	atc	cac	ccc	agg	tac	aac	tgg	cgg	gag	aac	ctg	gac	cgg	gac	att	576
Tyr	Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	
							180		185			190				
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	cct	gtt	gcc	ttc	agt	gac	tac	att	cac	624
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	
							195		200			205				
cct	gtg	tgt	ctg	ccc	gac	agg	gag	acg	gca	gcc	agc	ttg	ctc	cag	gct	672
Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
							210		215			220				
gga	tac	aag	ggg	cgg	gtg	aca	ggc	tgg	ggc	aac	ctg	aag	gag	acg	tgg	720
Gly	Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
							225		230			235			240	
aca	gcc	aac	gtt	ggt	aag	ggg	cag	ccc	agt	gtc	ctg	cag	gtg	gtg	aac	768
Thr	Ala	Asn	Val	Gly	Lys	Gly	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Val	
								245			250			255		

ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac tcc acc cgg atc cgc 816
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
260 265 270

atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag cct gat gaa ggg aaa 864
Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
275 280 285

cga ggg gat gcc tgt gaa gct gac ggg ggg gga ccc ttt gtc atg aag 912
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
290 295 300

agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt 960
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305 310 315 320

gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc 1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
325 330 335

cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag 1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
340 345 350

<210> 28
<211> 351
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20 25 30

Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
35 40 45

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
50 55 60

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75 80

Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
85 90 95

Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
115 120 125

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130 135 140

Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
145 150 155 160

Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Glu Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
165 170 175

Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
180 185 190

Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
195 200 205

Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
210 215 220

Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225 230 235 240

Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
245 250 255

Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
260 265 270

Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
275 280 285

Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
290 295 300

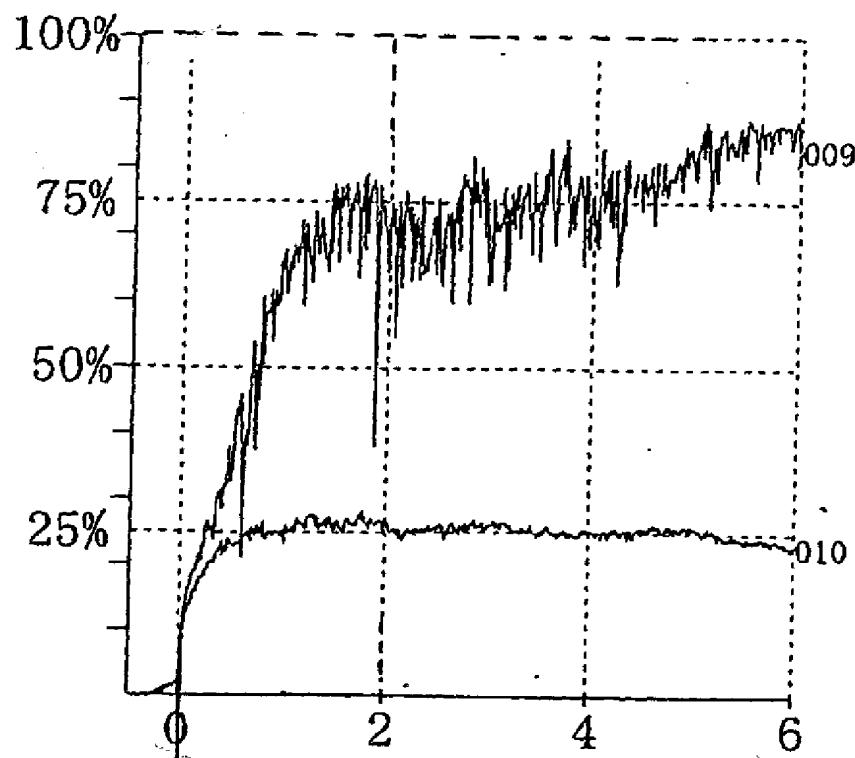
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305 310 315 320

Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
325 330 335

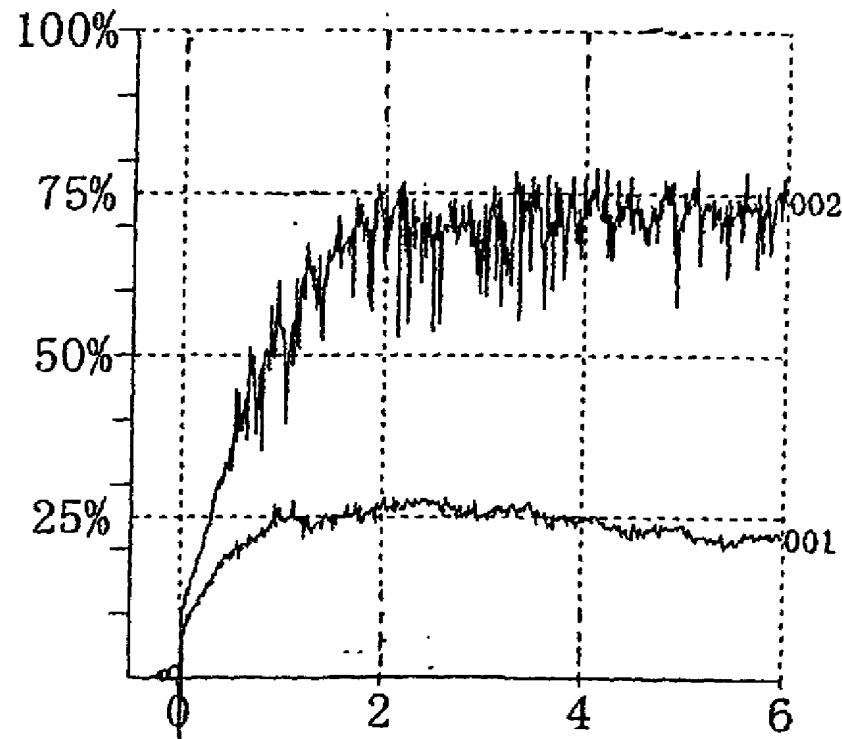
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
340 345 350

【書類名】図面

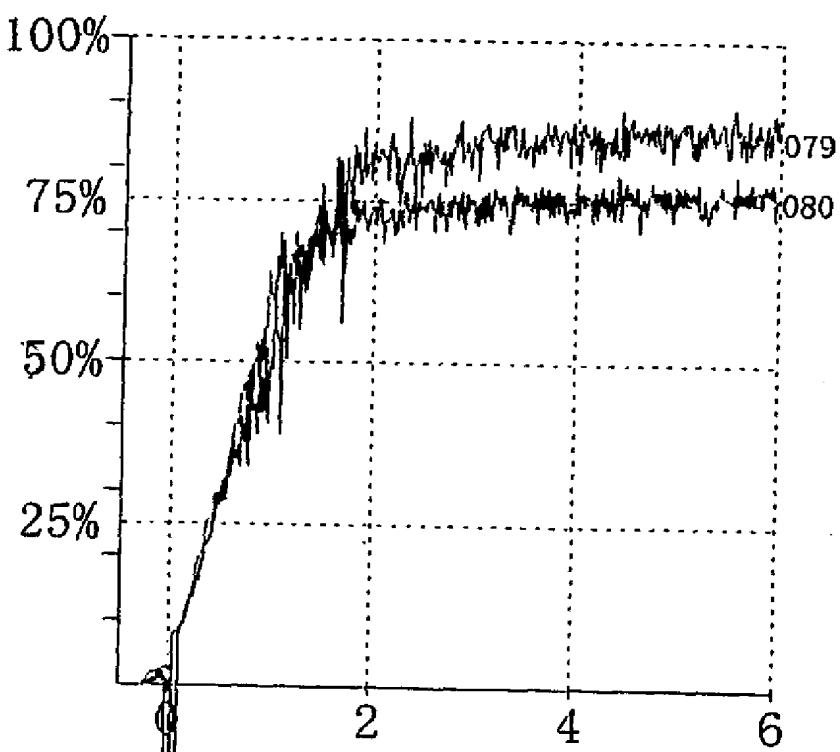
【図 1】



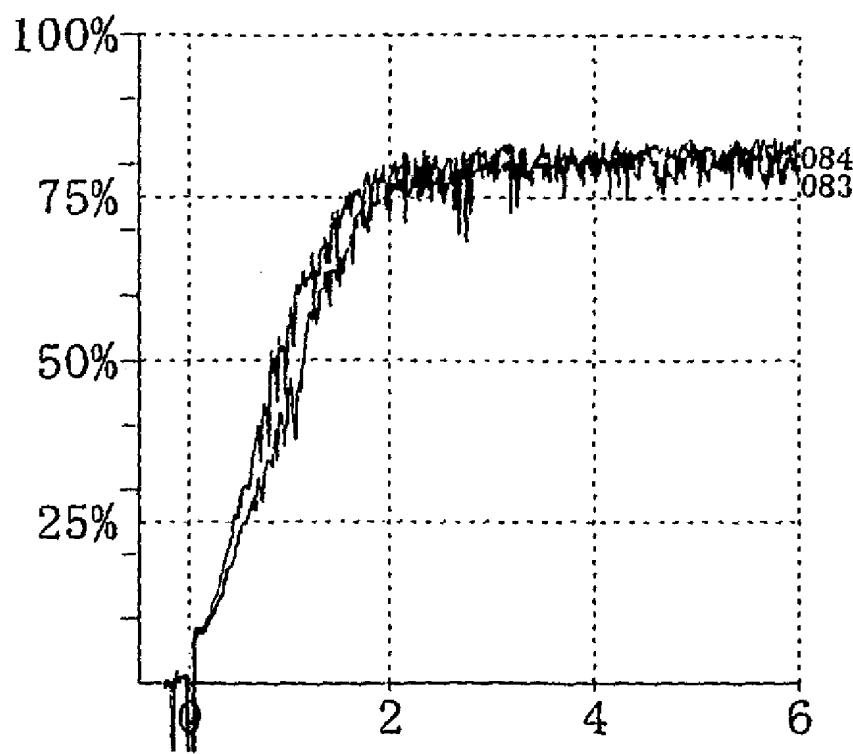
【図 2】



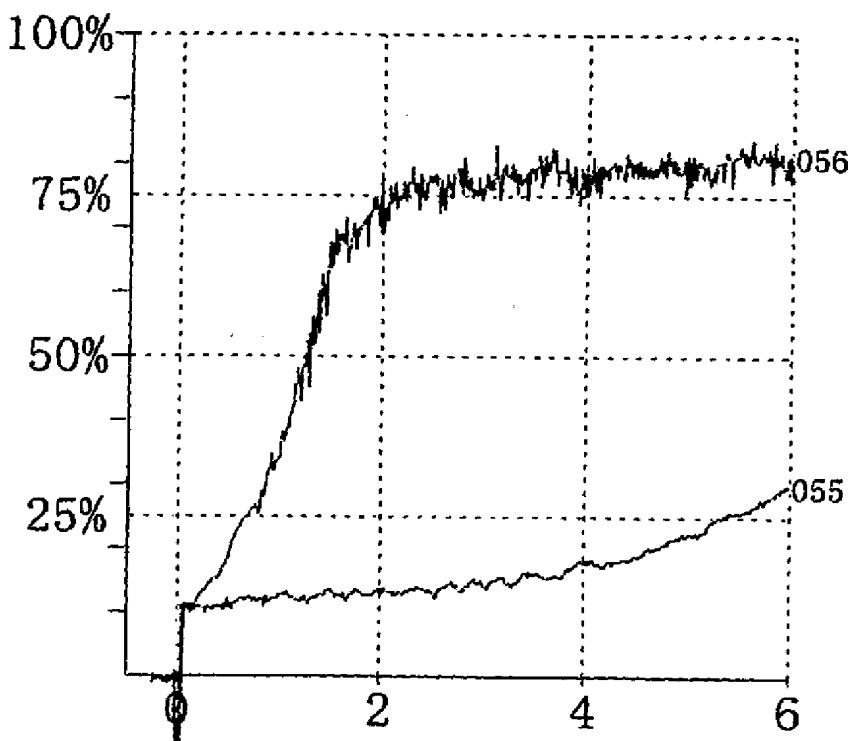
【図 3】



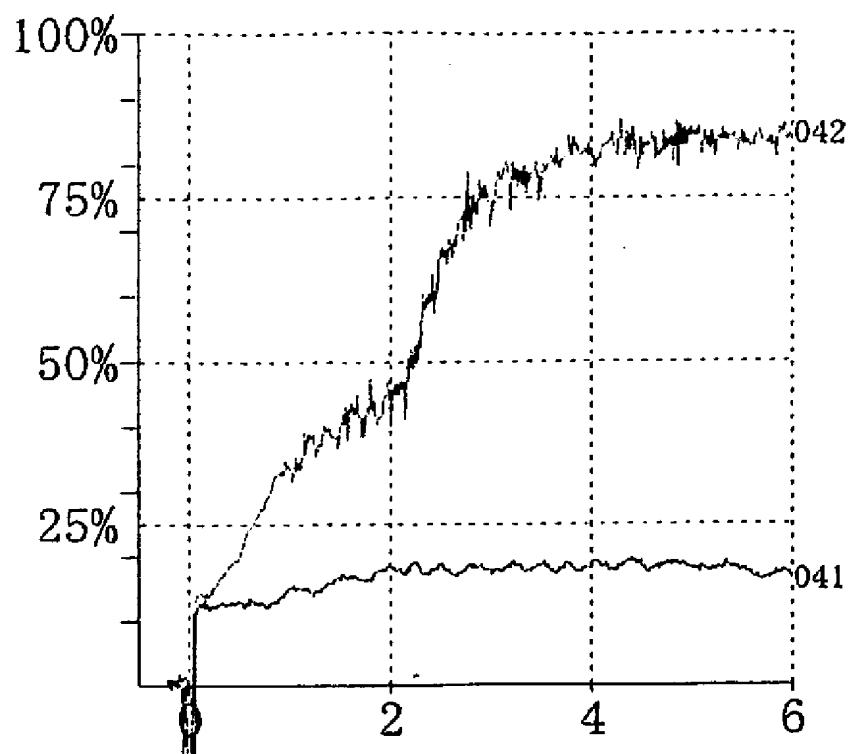
【図 4】



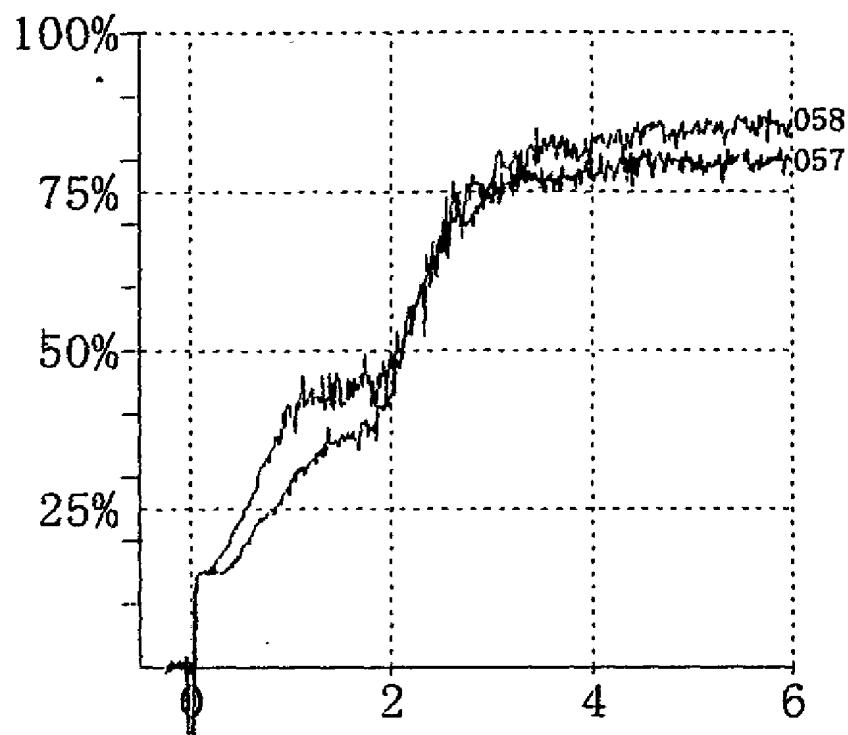
【図 5】



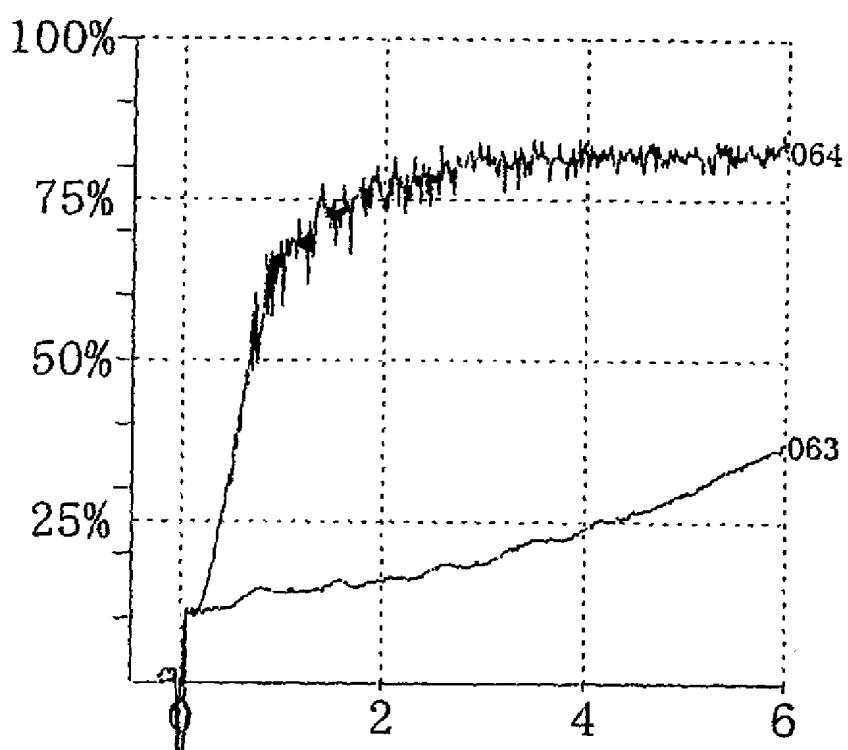
【図 6】



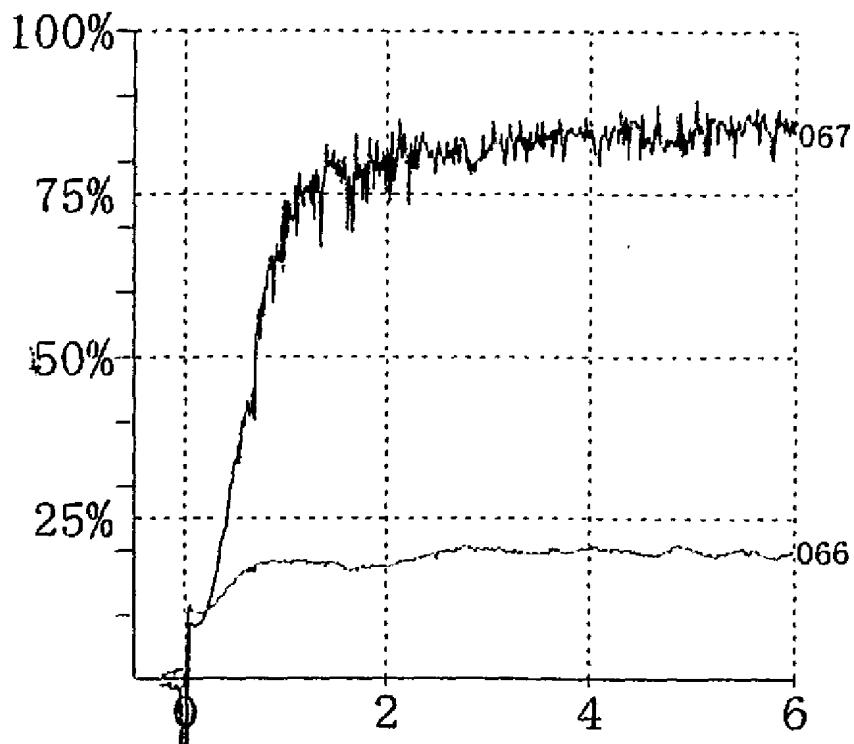
【図 7】



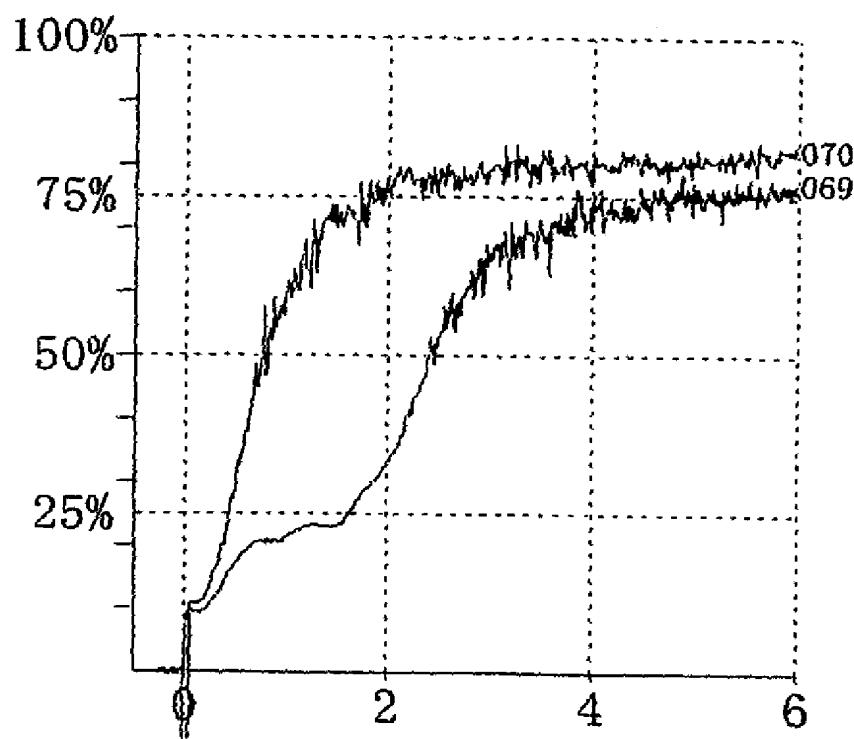
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 抗血栓治療薬又は抗炎症治療薬として好適なトロンビン誘導体を提供する。

【解決手段】 トロンビンにアミノ酸置換を導入し、アミノ酸置換トロンビン誘導体の中から基質分解活性が低下し、かつ基質結合能を保持したトロンビン誘導体を選択する。具体的にはB鎖203グリシン及びB鎖205セリンが置換されたトロンビン誘導体などを選択する。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 P-C40646HI
【提出日】 平成16年 6月 9日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2004-170346
【補正をする者】
 【識別番号】 000002071
 【氏名又は名称】 チツソ株式会社
【補正をする者】
 【識別番号】 000224101
 【氏名又は名称】 藤森工業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100100549
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 川口 嘉之
【手続補正】
 【補正対象書類名】 特許願
 【補正対象項目名】 代理権を証明する書面
 【補正方法】 追加
 【補正の内容】
 【提出物件の目録】
 【物件名】 委任状 1

【物件名】

委任状

【添付書類】



15

委任状

平成 16 年 6 月 9 日

私は、

識別番号 100089244 弁理士 遠山 勉 氏
識別番号 100090516 弁理士 松倉 秀実 氏
識別番号 100100549 弁理士 川口 嘉之 氏

を以て、代理人として下記事項を委任します。

言已

1. 特許願

に関する手続



1. 上記出願又は 特許 2004-80950
に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先
権の主張及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権及び意匠権に基づく権利及びこれらに關
する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は実用新案登録に対する登
録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録及び意匠登録に対する無
効審判の請求に関する手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正審判の請求
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に關し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所（居所）

東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号

氏名（名称）

藤森工業株式会社

（代 表 者）

代表取締役社長 藤森明彦



出願人履歴

0 0 0 0 0 2 0 7 1

19900823

新規登録

大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号

チツソ株式会社

0 0 0 2 2 4 1 0 1

19900830

新規登録

5 9 7 0 7 2 3 4 9

東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号

藤森工業株式会社